



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/86, A61K 48/00, C12N 9/00, 9/12, 15/03, 15/27, 15/12, 15/62, 15/52, 15/54		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 94/13823 (43) Date de publication internationale: 23 juin 1994 (23.06.94)															
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/BE93/00080</p> <p>(22) Date de dépôt international: 10 décembre 1993 (10.12.93)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 09201087 10 décembre 1992 (10.12.92) BE</p> <p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): Z. COMPANY S.A. [BE/BE]; 40, avenue Général-de-Gaulle, B-1050 Bruxelles (BE).</p> <p>(72) Inventeur; et</p> <p>(75) Inventeur/Déposant (<i>US seulement</i>): ZEICHER, Marc [BE/BE]; 18, rue Danse, B-1180 Bruxelles (BE).</p> <p>(74) Mandataire: VAN MALDEREN, Michel; Office van Malderen, Place Reine Fabiola 6/1, B-1080 Bruxelles (BE).</p>		<p>(81) Etats désignés: AU, BB, BG, BR, BY, CA, CZ, FI, HU, JP, KP, KR, KZ, LK, LV, MG, MN, MW, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SK, UA, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i></p>																
<p>(54) Title: NUCLEOTIDE SEQUENCE FOR TREATING CANCER AND INFECTION</p> <p>(54) Titre: SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE DESTINEE AU TRAITEMENT DU CANCER ET DES INFECTIONS</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A nucleotide sequence for treating cancerous and infected cells, including at least one effector sequence incorporated into the nucleotide sequence of a virus from the group of autonomous parvoviruses, for destroying or normalising said cells.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>Séquence nucléotidique destinée au traitement de cellules cancéreuses ou soumises à des infections comprenant, intégré dans la séquence nucléotidique d'un virus appartenant au groupe des parvovirus autonomes, au moins une séquence effectrice susceptible d'assurer la destruction ou la normalisation desdites cellules.</p>																		
<table border="1"> <caption>Data from the graph: pg/μg vs (DAY) (jour)</caption> <thead> <tr> <th>Day (jour)</th> <th>NHF (pg/μg)</th> <th>KMST-6 (pg/μg)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>10</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>20</td> <td>450</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>20</td> <td>550</td> </tr> </tbody> </table>				Day (jour)	NHF (pg/μg)	KMST-6 (pg/μg)	0	0	0	1	10	20	2	20	450	3	20	550
Day (jour)	NHF (pg/μg)	KMST-6 (pg/μg)																
0	0	0																
1	10	20																
2	20	450																
3	20	550																

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

10 SÉQUENCE NUCLÉOTIDIQUE DESTINÉE AU TRAITEMENT DU CANCER
 ET DES INFECTIONS

Objet de l'invention

15 La présente invention concerne une séquence nucléotidique destinée au traitement de cellules cancéreuses ou soumises à des infections.

La présente invention concerne également le vecteur comprenant la séquence selon la présente invention, ainsi qu'une composition pharmaceutique comprenant ladite séquence et/ou ledit vecteur.

20 L'invention s'étend également à l'utilisation de la séquence nucléotidique et/ou du vecteur selon l'invention pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de cellules cancéreuses ou soumises à des infections.

Arrière-plan technologique

25 L'efficacité des traitements conventionnels du cancer et des infections est limitée par leur manque de sélectivité. En effet, la toxicité liée à ces traitements ne se limite pas aux cellules cibles (cellules tumorales, cellules infectées), elle affecte aussi des cellules normales 30 d'importance vitale.

En conséquence, on a développé des systèmes de ciblage d'agents thérapeutiques qui permettent de diminuer la dose毒ique administrée aux tissus normaux tout en permettant à une dose毒ique efficace d'être administrée aux 35 tissus pathologiques.

Le brevet US-4 675 382 décrit des protéines hybrides clivables et constituées de fragments cytotoxiques et de ligands cytospécifiques, ainsi que leur application

thérapeutique ciblée dans le traitement de désordres médicaux.

Des protéines qui sont hautement cytotoxiques lorsqu'elles sont introduites dans les cellules de mammifères 5 sont produites par beaucoup d'espèces de bactéries et de plantes (fragment A de la toxine diphtérique (DT-A), de *Pseudomonas aeruginosa*, du Ricin...).

Des tentatives ont été faites pour remplacer la portion de ces protéines responsable de l'entrée cellulaire 10 par des ligands spécifiques de tumeurs (anticorps monoclonaux, peptides...) (Martinez et al, Cancer Surveys, 1, 374 (1982)).

Une autre stratégie employée par Maxwell (Cancer Research, 46, 4660-4664, september 1986), consiste à introduire l'ADN codant pour le fragment A de la toxine diphtérique, in vitro dans des cellules à l'aide de constructions 15 comportant des éléments de régulation transcriptionnelles spécifiques de tissus agissant en cis dans le but de n'exprimer la DTA que dans les cellules contenant les facteurs 20 agissant sur ces éléments de régulation.

D'autres techniques utilisent des gènes codant pour un enzyme conférant à la cellule transfectée une sensibilité 25 à un agent毒ique ont été décrites par Moolten F. (Human Gene Therapy 1: 125-134 (1990) et Venkatesh (P.N.A.S., vol. 87, p. 8746-8750, novembre 1990).

Le gène codant pour la Thymidine kinase de l'Herpès simplex type 1 (HSV-TK) est approprié à ce type de thérapie. Certains analogues de la guanosine tels que l'iodovinyldéoxyuridine (IVDU), l'acyclovir, le ganciclovir sont des substrats spécifiques pour l'HSV-TK, qui catalyse leur phosphorylation en monophosphates de façon plus efficace (plus de mille fois) que les thymidine kinases des cellules de mammifères. Une phosphorylation ultérieure en triphosphates 30 sous l'influence de kinases cellulaires convertit ces molécules en de puissants inhibiteurs de la synthèse d'ADN. Des doses d' ganciclovir, n'affectant pas la survie in vitro de cellules HSV-TK négatives, permettent de détruire in vitro 35 des cellules HSV-TK positives et d'éradiquer les lymphomes

HSV-TK positifs *in vivo* chez des souris transgéniques exprimant l'HSV-TK dans leurs cellules lymphoïdes.

Toutefois, pour certaines lignées cellulaires exprimant l'HSV-TK la dose d'analogues de guanosine permettant une cytotoxicité *in vitro* proche de 100% de mort cellulaire induit une cytotoxicité appréciable dans des lignées cellulaires n'exprimant pas l'HSV-TK (doses entre 10 et 100 μ M).

Une approche permettant d'éviter ce problème est d'utiliser des analogues de la guanosine marqués à l'aide de radio-isotopes émetteurs d'électrons AUGER tels que l'Iode 123 (demi-vie 13h21). Ces isotopes relâchent la majeure partie de leur énergie sur un parcours de quelques nanomètres. L'efficacité de tels radio-isotopes en ce qui concerne la cytotoxicité cellulaire est complètement perdue lorsqu'ils ne sont pas liés ou tout au plus à une distance de quelques nanomètres de l'ADN. S'ils sont dans le voisinage de l'ADN, une cinquantaine de désintégrations sont suffisantes pour tuer la cellule HSV TK positive. Une cytotoxicité maximale est obtenue lorsque les cellules incorporent l'analogue de la guanosine marqué à l'Iode 123 dans leur ADN à des doses inférieures à 10^{-10} M ce qui est largement inférieur au seuil de toxicité de cet analogue pour les cellules ne possédant pas de HSV-TK.

En outre, l'Iode 123 est également émetteur d'un rayonnement γ qui peut être détecté à l'aide d'une gammacaméra en clinique.

Après concentration *in vivo* de l'analogue marqué dans les tissus exprimant l'HSV-TK et l'élimination de l'analogue de la guanosine du flux sanguin et des autres tissus, il y a possibilité de détecter à l'aide d'une gammacaméra les tissus exprimant l'HSV-TK (application à la détection de métastases).

Cette approche, comparée à l'expression du fragment A de la toxine diphtérique, a l'avantage de permettre un contrôle de l'intensité et du déroulement de l'attaque cytotoxique.

L'administration de l'analogue de la guanosine peut

être moauiee en fonction de l'évolution clinique (evolution des tissus cancéreux et toxicité infligée aux tissus normaux).

La thérapie génique peut également utiliser des 5 gènes générant après transcription des ARN inhibant l'expression d'un oncogène impliqué dans l'affection tumorale.

Le concept d'utiliser des séquences antisens d'acides nucléiques pour bloquer la fonction de l'ARN messager avec lequel elles s'hybrident s'est développé au cours de la 10 dernière décade. L'action inhibitrice des molécules antisens sur l'expression génique dépend soit de la stabilité de l'hybride ARN antisens-ARN cible soit de la capacité de l'hybride ADN antisens-ARN cible d'induire une destruction protéique enzymatique de l'ARN cible.

15 De même, il a été démontré que l'ARN lui-même pouvait avoir une activité enzymatique et que des molécules d'ARN catalytiques (Ribozymes) pouvaient être modifiées pour créer des unités antisens qui par leur liaison spécifiques aux molécules d'ARN cible catalysaient leur clivage.

20 Ainsi, Haseloff et Gerlach (Nature, 334 (1988), p. 585-591) ont fusionné la région catalytique de ribozymes "hammerhead" à 2 ARN anti-sens reconnaissant la séquence cible d'un ARN à cliver.

Plus récemment, Herschlag (Nature, vol. 344, p. 25 405, 1990) ont décrit certains ribozymes qui peuvent également cliver de façon spécifique des ADN cibles et qu'il y avait moyen de sélectionner *in vitro* les ribozymes mutants clivant l'ADN de façon plus efficace que l'enzyme sauvage.

30 In vitro, l'inhibition par de l'ARN antisens des gènes E6 et E7 (codant pour les oncogènes E6 et E7 dans les cellules de cancers du col utérin associés à une infection par les papillomavirus humains HPV16, 18, 31 et 33) induit une réversion du phénotype cancéreux vers le phénotype normal dans des lignées de cancer du col utérin (Schlegel...).

35 En outre, il est démontré que des ARN peuvent être sélectionnés parmi des librairies de séquences nucléotidiques pour obtenir des ARN à activité enzymatique spécifique ou des ARN utilisés comme ligands spécifiques.

L'utilisation de gènes codant pour une protéine augmentant les mécanismes de défense de l'hôte a été également décrite.

Dans la demande de brevet WO 90/11359, Baltimore et al. décrivent des constructions nucléotidiques recombinantes comportant des séquences régulatrices du virus HIV et des séquences codant pour des produits cytotoxiques affectant spécifiquement les cellules infectées par les virus HIV ou HTLV.

La séquence virale conservée est constituée de tout ou partie de la séquence régulatrice LTR (Long Terminal Repeat) du virus. Cette séquence peut être transactivée au niveau d'une séquence promotrice TAR par les facteurs de transactivation viraux spécifiques TAT des virus HIV et TAX des virus HTLV, exprimés dans les cellules infectées par ces virus (Sodroski J. et al., *Science* (1985) 227, 171-173).

L'activation de la séquence promotrice permet ensuite l'expression de la séquence codant pour des produits cytotoxiques entraînant la mort des cellules infectées par le virus HIV.

Cependant de telles constructions nucléotidiques peuvent comporter des séquences de LTR, autres que la séquence TAR.

Ces séquences, telles que les éléments enhancer NF-Kappa B (Greene, *Annual Rev. Immunol.*, 1990, 8, p. 453) sont transactivables par des activateurs cellulaires, ou telles que l'élément NRE (Negative Regulatory Element) sont transactivables par le facteur viral NEF (Kieny, *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 3, p. 395 (1990)).

De tels facteurs peuvent donc activer les gènes cytotoxiques dans des cellules saines ou les désactiver dans des cellules infectées par le virus.

La demande de brevet WO 90/07936 et le document "Aids Research and Human Retroviruses" (vol. 8, n° 1, 1992, Mary Ann Liebert, Inc., Publisher) décrivent l'intégration dans des vecteurs viraux ou des plasmides des constructions nucléotidiques comportant des séquences régulatrices transactivables par des facteurs spécifiques d'une affection

(telle que le SIDA) et des séquences codant pour des produits cytotoxiques affectant spécifiquement les cellules soumises à des désordres hyper-prolifératifs ou à des infections.

La demande de brevet WO91/18088 décrit l'utilisation de parvovirus adénoassociés à faible efficacité de transduction (0,5 à 1,5% pour une multiplicité d'infection (Moi) de 1 à 10) qui présentent en outre l'inconvénient de ne pas être oncosélectifs et de s'intégrer dans le génome des cellules transductées.

Aussi, la technique décrite dans ce document nécessite une modification *in vitro* des cellules hématopoïétiques avant d'être réinjectées après transduction au patient.

La demande de brevet WO90/05538 décrit une méthode de production de capsides vides de parvovirus autonomes pour:

- 15 - la vaccination à l'aide de capsides vides;
- le diagnostic pour détecter des anticorps anti-capsides;
- l'encapsidation de matériel génétique dans des capsides vides et l'introduction de ce matériel dans des cellules cibles. Les auteurs ici envisagent l'encapsidation de
- 20 matériel génétique hétérologue (non dérivé de parvovirus autonomes), l'exemple cité étant les vecteurs adénoassociés parvovirus. Le parvovirus décrit (B19) est un parvovirus autonome pathogène s'exprimant sélectivement dans les cellules souches hématopoïétiques. La capsid vide est
- 25 ensuite utilisée pour corriger des déficiences génétiques dans des cellules souches hématopoïétiques.

Le document *Virology* (vol. 186, n° 1, p. 207-218) décrit un *Densovirus* (parvovirus n'infectant que les insectes). Ce virus n'est pas infectieux pour les cellules de mammifères et ne peut donc en aucun cas être utilisé pour la thérapie génétique du cancer ou des infections chez l'homme.

Le document (*Proc. Natl. Acad. of Science, USA* (1990, vol. 87, p. 8746-8750) préconise l'utilisation de vecteurs adénoviraux pour le traitement des infections à HIV. Ces vecteurs adénoviraux contiennent encore une importante partie du génome des adénovirus et récemment, leur utilisation en tant que vecteur de thérapie génique de la mucoviscidose.

dose a provoqué de graves réactions inflammatoires. Les séquences régulatrices et effectrices utilisées présentent de plus les inconvénients suivants:

- la séquence LTR utilisées va de -640 à +80 et doit donc 5 conférer une activité basale très importante en l'absence de tat;
- le fragment (1084 bp) devant permettre la régulation par Rev, est particulièrement court et selon les auteurs, ne confère pas de régulation par Rev.

10 En outre, la thymidine kinase de l'HSV utilisée comme séquence effectrice confère un "bystander effect" qui risque de tuer les cellules non infectées avoisinantes.

La demande de brevet WO-A-8808450 est basée sur l'adjonction à des cellules souches humaines, après leur 15 isolation *in vitro*, d'un gène à vertu thérapeutique et de leur réinjection *in vivo* dans le patient. Parmi les différentes méthodes d'introduction de gène hétérologue dans les cellules souches, les auteurs envisagent les vecteurs parvoviraux, à savoir les vecteurs parvoviraux adénoassociés.

20 De même, les demandes de brevet WO-A-9007936, WO-A-9012087 et WO-A-9102805 décrivent des vecteurs viraux tels que des rétrovirus, des adénovirus ou les virus adéno-associés pour la thérapie génique.

Cependant, ces vecteurs viraux ou plasmidiques 25 présentent un danger potentiel en s'intégrant dans les cellules hôtes d'activer des protooncogènes ou d'annihiler des gènes suppresseurs de tumeurs (anti-oncogènes).

Buts de l'invention

30 L'invention a pour but de fournir une séquence nucléotidique virale comportant une séquence nucléotidique susceptible de détruire ou de normaliser des cellules cancéreuses ou soumises à des infections.

35 Un autre but de l'invention consiste à fournir un vecteur viral qui, sans s'intégrer dans leur génome, est susceptible de s'exprimer efficacement dans l'environnement intracellulaire desdites cellules.

Eléments principaux de l'invention

L'invention concerne une séquence nucléotidique

destiné au traitement de cellules cancéreuses ou soumises à des infections, comprenant, intégré dans la séquence nucléotidique d'un virus appartenant au groupe des parvovirus autonomes, une séquence effectrice susceptible d'assurer la destruction ou la normalisation des cellules.

On entend par le terme "traitement" une réduction ou un allégement des symptômes de l'affection, l'élimination ou l'inhibition des agents causaux, la prévention de l'infection ou du désordre cellulaire du sujet soumis à l'affection.

Le terme "infection" se rapporte à des infections de cellules par des agents viraux, bactériens ou d'autres parasites infectieux intracellulaires.

L'invention concerne tout particulièrement des agents infectieux viraux tels que le HIV-I, le HIV-II, le HIV-III, le HTLV-I, le HTLV-II, l'herpès simplex virus (HSV), le cytomégalovirus (CMV), les papillomavirus humains (HPV) et d'autres virus similaires.

Les virus selon l'invention sont les virus appartenant au groupe des parvovirus autonomes de préférence onco-selectifs. Ce sont de petits virus sans enveloppe dont le génome est constitué d'un ADN simple brin linéaire d'environ 5 KD. Leur faible complexité génétique les rend totalement dépendant de facteurs exogènes pour leur réplication. Ils ne se répliquent efficacement que dans l'environnement intracellulaire des cellules tumorales dans lesquelles ils se trouvent sous forme épisomique (J. Rommelaere, *Handbook of Parvoviruses*, 1990, vol. 2, p. 41-57, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida).

Ils ne s'intègrent pas dans le génome des cellules comme les rétrovirus et ne présentent donc pas le danger potentiel d'activer des protooncogènes ou d'annihiler les gènes suppresseurs de tumeurs. Leur oncotropisme et leur caractère épisomique en font des vecteurs de choix pour la thérapie génique ciblée de tumeurs et d'infections intracellulaires.

Préférentiellement, le vecteur viral utilisé est le Parvovirus H1, le Parvovirus fibrotropique du "minute virus of mice" (MVMp) ou le Parvovirus Lu III.

La plupart des lignées de cellules cancéreuses humaines testées à ce jour se sont révélées permissives pour l'infection par les parvovirus H1 et le variant fibrotropique du "minute virus of mice (MVMp)". Ces virus ont des propriétés 5 oncoprotectorices *in vivo* et peuvent causer la régression de tumeurs humaines en souris nues même après inoculation virale à un site distant de la tumeur. L'H1 et le MVMp sont de petits virus contenant un ADN simple brin de 5 kb bordé de 2 boucles palindromiques en épingle à cheveu.

10 Chez ces parvovirus, deux promoteurs, P4 et P38, contrôlent respectivement l'expression de deux protéines non structurelles (NSI et NSII) et de deux protéines de capsides (VP1 et VP2). P4 contrôle NSI et NSII et P38, VP1 et VP2. NSI est un facteur de transactivation de P38 et est responsable 15 de l'activité cytotoxique. NSI est en outre nécessaire pour la réplication virale et la restriction ou permissivité pour l'infection virale semble liée au niveau de transcription de NSI.

20 Selon une forme d'exécution préférée de l'invention, le vecteur viral est dépourvu des gènes codant pour les protéines de capsides (VP1 et VP2) du parvovirus. Préférentiellement, le vecteur viral est également dépourvu du promoteur P38 et des gènes codant pour les protéines non structurelles NSI et NSII du Parvovirus.

25 De préférence, on utilise le parvovirus autonome pMM 984, décrit par Merchlinsky et al. (J. of Virology, 47, p. 227-232 (1983)).

30 L'expression "assurant la destruction ou la normalisation des cellules" signifie que lors d'une infection ou à l'occasion d'un cancer, l'expression de la séquence effectrice dans la cellule hôte permet soit de tuer celle-ci, soit de la rendre sensible à un agent exogène toxique ou soit de la rendre capable d'inhiber l'action du cancer ou de l'agent infectieux.

35 Le terme "séquence effectrice" se rapporte à une séquence nucléotidique qui, lorsqu'elle s'exprime, par exemple lorsque, sous l'action de facteurs de transactivation spécifiques agissant sur une séquence régulatrice, elle code

pour un polypeptide effecteur susceptible de détruire ou de normaliser des cellules traitées.

De même, cette séquence effectrice lorsqu'elle est transcrise en un ARN, par exemple un ARN anti-sens ou un 5 ribozyme, est susceptible de détruire ou de normaliser des cellules traitées.

Par exemple, l'on peut créer un ribozyme qui détruit spécifiquement le transcript ARN résultant de la fusion de l'exon 3 du gène bcr à l'exon 2 du gène abl, rencontrée 10 dans des cellules de leucémie myéloïde chronique. Szczylik et al. (Science, 253, 562 (1991)) ont pu montrer que des ARN anti-sens anti bcr-abl inhibaient la prolifération des cellules de leucémies myéloïdes chroniques.

L'ADN codant pour ce ribozyme peut être placé au 15 site de restriction Ase I qui se trouve dans le petit intron du génome MVM_p. Lors de l'épissage des ARN messagers du MVM_p, ce ribozyme sera libéré par le spliceosome dans un compartiment nucléaire riche en ARN cible.

La stabilité de tels ribozymes peut être augmentée 20 par l'adjonction en 3' d'une séquence telle que la séquence terminatrice de transcription du bactériophage T7. Cette séquence protégera le ribozyme de la digestion par des exonucléase 3' (Sioud et al., J. Mol. Biol. (1992), 223, p. 831-835).

25 L'on peut augmenter la taille de l'ADN parvoviral d'environ 100 nucléotides tout en conservant encore la capacité d'encapsidation et le pouvoir infectieux des parvovirus formés. Un tel virus recombinant contenant un ribozyme a la faculté de se reproduire dans le tissu tumoral tout en le 30 détruisant et peut réinfecter d'autres cellules tumorales, s'y développer et les tuer.

De préférence, la séquence effectrice est constituée de plusieurs séquences nucléotidiques codantes ou non, agencées en sous-unités polycistroniques, sous le contrôle 35 d'une seule unité promotrice.

La transfection de cellules tumorales par des séquences nucléotidiques codant pour différentes molécules biologiquement actives (cytokines, protéines membranaires

intervenant dans la reconnaissance immunitaire,...) et la réinjection de ces cellules irradiées dans des animaux porteurs de tumeurs a pu dans certaines conditions expérimentales entraîner le rejet spécifique de tumeurs identiques aux 5 cellules transfectées (Pardoll et al., *Immunology Today*, vol. 14, n° 6, p. 310-316 (1993)).

Toutefois, la plupart de ces molécules, outre leur propriété d'augmenter l'immunogénicité des tumeurs, stimulent la néovascularisation tumorale. Aussi, la séquence effectrice 10 comprend également des séquences codant pour des molécules inhibitrices de la néoangiogénèse tumorale (Billington D.C., *Drug design and discovery*, vol. 8, p. 3-35 (1991)) telles que l'Interferon α , l'Interferon β ou le Platelet Factor 4 (Maione et al., *Cancer Research*, 51, p. 2077-2083 (1991)).

15 Plusieurs gènes effecteurs d'une même séquence effectrice peuvent être insérés dans le même vecteur en les agençant en unités polycistroniques où les différents gènes sont reliés par des séquences nucléotidiques permettant leur expression suite à l'activation d'un seul promoteur situé en 20 amont du premier gène effecteur. Parmi les séquences nucléotidiques possédant cette propriété, il y a notamment les I.R.E.S. (Internal Ribosome Entry Sites) (Tsukiyama-Kohara, *J. of Virology*, p. 1476-1488 (1992)).

25 L'utilisation de vecteurs parvoviraux autonomes, de préférence oncosélectifs, permet de faire synthétiser directement *in vivo* par les cellules tumorales des tissus cancéreux du patient, les différentes molécules favorisant le rejet des tissus cancéreux. Ceci représente un progrès énorme par rapport à la méthode décrite par Pardoll où l'on 30 doit exciser un morceau de tumeur du patient, en faire une suspension cellulaire, la transfecter, l'irradier et la réinjecter au patient.

35 Avantageusement, la séquence nucléotidique effectrice ou une parti de celle-ci code pour au moins un poly-peptide de fusion, comportant notamment un ligand (secrétabl), t l que l'extrémité hypervariable spécifique d'un anticorps (single chain antibody), une cytokine ou un facteur de croissance, se liant de manière spécifique à au

moins une molécule exprimée à la surface de cellules cancéreuses ou soumises à des infections.

De la sorte, la fraction des cellules cibles ayant été infectées par les parvovirus autonomes recombinants, 5 synthétiseront et sécrèteront en grande quantité les polypeptides de fusion (immunotoxines, immunocytokines, immunoenzymes,...). Ces polypeptides de fusion iront se fixer principalement sur les cellules cancéreuses non infectées et ce procédé permettra d'augmenter l'effet "bystander" et 10 l'effet à distance de la thérapie génique.

Selon une forme d'exécution préférée de l'invention, la séquence effectrice ou une partie de la séquence effectrice, code:

- pour au moins un polypeptide ou fragment(s) de ce polypeptide cytotoxique, préférentiellement pour le fragment A de la toxine diphtérique (DTA);
- pour une molécule, telle qu'une enzyme, conférant à une cellule une sensibilité à un agent toxique, ladite molécule étant préférentiellement la thymidine kinase de l'Herpès simplex virus type 1 (HSV-TK) et l'agent toxique un analogue de guanosine marqué à l'aide de radio-isotopes émetteurs d'électrons Auger, tels que l'Iode 123;
- pour au moins un polypeptide ou fragment(s) de ce polypeptide, augmentant la réponse immunitaire du patient;
- 25 - pour au moins un polypeptide ou fragment(s) de ce polypeptide, inhibant la néoangiogénèse tumorale.

Parmi les différentes protéines cytotoxiques disponibles (DT-A, RicinA, Gelonine, Toxine de *Pseudomonas aeruginosa*) le choix de la DT-A est préféré. En effet, comme 30 la majorité de la population a été vaccinée contre la toxine diphtérique, tout éventuel relargage de DT-A par les cellules mortes sera annihilé par le système immunitaire. En outre, comme la DT-A est dépourvue de site de liaison à un récepteur cellulaire, elle ne pourra pas entrer dans d'autres cellules.

35 La production de DT-A dans les cellules de mammifères résulte en l'inhibition de toute synthèse protéique ultérieure (par ADP ribozylation du facteur d'elongation -2) et par conséquent mène à la mort cellulaire. Comme la DTA

agit de façon catalytique et non stoechiométrique, quelques molécules de DTA sont suffisantes pour tuer une cellule.

Le fragment A libéré dans les cellules infectées par HIV non seulement entraîne la mort cellulaire, mais 5 bloque également toute synthèse protéique y compris la synthèse des protéines virales et de ce fait bloque la réinfection des cellules voisines.

Avantageusement, la séquence effectrice peut être modifiée par exemple par une mutagénèse dirigée afin d'atténuer 10 la cytotoxicité de la protéine produite.

Selon une forme d'exécution préférée de l'invention, la séquence nucléotidique comprend également au moins une séquence régulatrice transactivable par des facteurs de transactivation spécifique de l'affection traitée 15 ou du tissu cellulaire affecté, et apte à cisactiver la séquence effectrice.

L'expression "assurant la destruction ou la normalisation des cellules" signifie que lors d'une infection ou à l'occasion d'un cancer, l'expression de la séquence effectrice dans la cellule hôte permet soit de tuer celle-ci, soit de la rendre sensible à un agent exogène toxique ou soit de la rendre capable d'inhiber l'action du cancer ou de l'agent infectieux.

Le terme "séquence effectrice" se rapporte à une 25 séquence nucléotidique qui, lorsqu'elle s'exprime (par l'action de facteurs de transactivation spécifique sur la séquence régulatrice), permet de détruire ou de normaliser les cellules traitées.

Selon une forme d'exécution préférée de l'invention, la séquence effectrice code soit pour une protéine cytotoxique, préférentiellement le fragment A de la toxine diphtérique (DTA); soit pour une enzyme conférant à la cellule transfectée une sensibilité à un agent toxique, l'enzyme sera préférentiellement la thymidine kinase de l'Herpès 30 simplex virus typ 1 (HSV-TK).

Parmi les différentes protéines cytotoxiques disponibles (DT-A, Ricina, Gelonine, Toxine de *Pseudomonas a ruginosa*) le choix de la DT-A semble approprié. En effet,

comme la majorité de la population a été vaccinée contre la toxine diphtérique, tout éventuel relargage de DT-A par les cellules mortes sera annihilé par le système immunitaire. En outre, comme la DT-A est dépourvue de site de liaison à un 5 récepteur cellulaire, elle ne pourra pas entrer dans d'autres cellules.

La production de DT-A dans les cellules de mammifères résulte en l'inhibition de toute synthèse protéique ultérieure (par ADP ribozylation du facteur d'elongation -2) 10 et par conséquent mène à la mort cellulaire. Comme la DTA agit de façon catalytique et non stoechiométrique, quelques molécules de DTA sont suffisantes pour tuer une cellule.

Le fragment A libéré dans les cellules infectées par HIV non seulement entraîne la mort cellulaire, mais 15 bloque également toute synthèse protéique y compris la synthèse des protéines virales et de ce fait bloque la réinfection des cellules voisines.

Avantageusement, la séquence effectrice peut être modifiée par exemple par une mutagénèse dirigée afin d'atténuer 20 la cytotoxicité de la protéine produite.

Selon une forme d'exécution préférée de l'invention, la séquence nucléotidique comprend également au moins une séquence régulatrice transactivable par des facteurs de transactivation spécifique de l'affection traitée 25 ou du tissu cellulaire affecté, et apte à cisactiver la séquence effectrice.

Le terme "séquence régulatrice transactivable" se rapporte à une séquence nucléotidique qui est capable de répondre à un facteur de transactivation spécifique et d'activer 30 en réponse la transcription de séquences situées en cis.

Selon une autre forme d'exécution de l'invention, la séquence régulatrice comporte tout ou partie de la séquence régulatrice LTR (Long terminal Repeat) des virus HIV 35 ou HTLV comprenant la séquence TAR (TAT responsive element).

Préférentiellement, la séquence LTR est dépourvu de la séquence enhancer Kappa B transactivable par des facteurs cellulaires et/ou de la séquence NRE transactivable par

le facteur viral NEF.

La suppression de ces séquences au sein de la séquence LTR réduisent de manière surprenante l'expression de la séquence nucléotidique de l'invention dans les cellules 5 n'exprimant pas la protéine TAT sans diminuer l'expression de la séquence nucléotidique de l'invention dans les cellules exprimant la protéine TAT.

Avantageusement, la séquence nucléotidique comporte également une séquence régulatrice constituée de tout ou 10 partie de la séquence RRE (Rev-Responsive Element) et de la séquence adjacente CRS des virus HIV et HTLV (Rosen, P.N.A.S., vol. 85, p. 2071-2075 (1988)) et de sites adjacents d'épissages.

Les séquences TAR (situées dans le LTR des virus 15 HIV et HTLV et transactivables par les protéines virales TAT du HIV et TAX du HTLV) et RRE (situées dans la séquence ENV des virus HIV et HTLV et répondant aux protéines REV du HIV et REX du HTLV) et de sites adjacents d'épissages sont par exemple des séquences utilisables pour le traitement des 20 infections par ces rétrovirus (Rosen G., Editorial Review, Aids 1990, 4, 499-509).

Le grand degré de conservation de ces séquences permet de traiter les cellules infectées par les différentes souches de HIV à l'aide de la même construction nucléotidi- 25 que.

On place également la séquence effectrice sous le contrôle de la protéine Rev de HIV, car en l'absence de Rev, tout mRNA qui contient la séquence RRE est bloqué dans le spliceosome nucléaire et ne peut être exporté dans le cytoplasme vers les ribosomes. 30

Selon une autre forme d'exécution préférée de l'invention, la séquence régulatrice est constituée d'au moins une séquence promoteur "enhancer", de préférence spécifique du cytomégalovirus et la séquence effectrice est transcrit en un ribozyme clivant spécifiquement l'ARN messager codant pour la protéin α du cytomégalovirus (Griffiths P., Biochem J., 241, p. 313-324 (1987)).

Selon une autre forme d'exécution préférée de

l'invention, la séquence régulatrice est constituée d'au moins un promoteur et/ou d'au moins un enhancer transactivable dans certains tissus spécifiques, de préférence choisis parmi le groupe constitué par:

- 5 - la séquence nucléotidique contrôlant l'expression du gène codant pour l'α foetoprotéine (AFP), cette région n'étant transactivée que dans les cellules d'hépatomes, de chorio-carcinome et dans de rares cellules hépatiques (Sakai M., *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 260, n° 8, p. 10 5055-5060 et Nakabayashi H., vol. 264, n° 1, p. 266-271);
- 15 - la séquence nucléotidique contrôlant l'expression de la protéine placentaire humaine 11 (PP11). La PP11 n'est exprimée que dans le placenta (syncytiotrophoblaste) et on ne la trouve dans aucun tissu adulte normal, mais par immunohistochimie on la détecte dans 47% des cancers du sein, dans 67% des carcinomes ovariens, et dans 38% des cancers testiculaires et gastriques étudiés (Grundmann U., *DNA and Cell Biology*, vol. n° 9, n° 4, 1990, p. 243-250);
- 20 - la séquence nucléotidique contrôlant l'expression de l'antigène CO - 029 qui est détectée dans des carcinomes de l'estomac, du côlon, du rectum et du pancréas mais n'est pas détecté dans les tissus normaux (Szala S., *PNAS*, vol. 87, p. 6833-6837 (1990));
- 25 - la séquence nucléotidique contrôlant l'expression de l'antigène H23 (breast-cancer-associated antigen) détecté chez l'humain dans 90% des cancers du sein (Tsarfaty I., *Gène*, 93, (1990) p. 313 à 318);
- 30 - la séquence nucléotidique contrôlant l'expression prostatique de la protéine sécrétoire prostatique PSP94; dans les cancers de la prostate à un stade avancé, après prostatectomie, le seul tissu de l'organisme synthétisant la PSP94 est le tissu tumoral prostatique (Linard C., *Gene*, 73 (1988), p. 479-487);
- 35 - la séquence nucléotidique contrôlant l'expression de la protéine pHGR11 associée au mélanome, au cancer ovarien, à l'adénocarcinome du côlon et de la prostate; les seules cellules normales où pHGR11 est exprimé, sont les cellules de la granulosa de l'ovaire (Rapp G., *DNA and cell Biology*,

vol. 9, n° 7, p. 479-485);

- la séquence nucléotidique contrôlant l'expression de la protéine pHGR74, exprimée dans les testicules, la prostate, la vésicule séminale et la granulosa de l'ovaire;
- 5 - ainsi que les séquences contrôlant l'expression de protéines spécifiques de l'épithélium mammaire, de l'épithélium utérin;
- la séquence nucléotidique contrôlant l'expression de la tyrosinase, exprimée dans les mélanocytes et le mélanome malin (Kwon B., PNAS, vol. 84, p. 7473-7477);
- 10 - les séquences contrôlant l'expression de l'élastase, exprimée uniquement dans le pancréas exocrine (Cell, vol. 9, 435-443 (1987));
- la séquence nucléotidique contrôlant l'expression hypo-15 physaire de la prolactine (Peers B., Molecular and Cellular Biology, sept. 1990, p. 4690-4700).

La présente invention concerne aussi un vecteur recombinant (viral ou plasmidique) comprenant la séquence ou une partie de la séquence selon l'invention.

20 L'invention concerne également une composition pharmaceutique pour le traitement de cellules cancéreuses ou soumises à des infections comprenant au moins une séquence et/ou le vecteur selon l'invention et un véhicule pharmaceutique adéquat.

25 Selon une forme d'exécution préférée de l'invention, cette composition pharmaceutique comprend également un ou plusieurs agents vitaux sauvages appartenant au groupe des parvovirus autonomes.

30 Un autre aspect de l'invention concerne l'utilisation de la composition pharmaceutique, de la séquence et/ou du vecteur selon l'invention pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de cancers et/ou d'infections.

Brève description des figures

35 La figure 1 représente une vue schématique de la séquence nucléotidique de l'invention.

La figure 2 représente les courbes de croissance (nombre de cellules $\times 10^{-4}$) de fibroblastes humains normaux (NHF) et de fibroblastes transformés

(KMST-6) en fonction du temps (jour après infection).

La figure 3 5 représente l'expression de CAT (Pg CAT/10 µg d'extrait cellulaire) dans ces deux lignées cellulaires en fonction du temps (jour après infection).

La figure 4 10 représente l'expression de la protéine CAT après deux jours d'infection de différentes lignées cellulaires normales (rectangle blanc) ou transformées (rectangle rayé) (a=fibroblastes, b=cellules épithémiale, c=lymphocytes T, d=lymphocytes B, e=Macrophages)

Description d'une forme d'exécution préférée de l'invention

La figure 1 représente une séquence nucléotidique 15 (1) selon l'invention et la séquence polypeptidique (7) codée par ladite séquence nucléotidique (1).

Cette séquence nucléotidique (1) comprend intégré 20 dans un vecteur parvoviral autonome (2), sous le contrôle d'au moins une séquence régulatrice (4), au moins une séquence effectrice (3). Ladite séquence effectrice (3) est de préférence constituée de plusieurs sous-unités polycistroniques codantes (5,6).

Ladite séquence effectrice (3) code de préférence 25 pour un polypeptide de fusion (7) comprenant au moins un ligand (8) et une séquence polypeptidique effectrice proprement dite (9) telle qu'un polypeptide cytotoxique.

Les exemples ci-après sont donnés à titre purement indicatif et permettent d'illustrer d'autres caractéristiques et avantages de la présente invention.

30 Exemple 1: Traitement de l'infection à H.I.V.

Les séquences virales utilisées sont d'une part la séquence LTR 5' du HIV modifié de façon à être contrôlé par la protéine TAT du HIV et à échapper au contrôle de facteurs de transactivation cellulaire, et d'autre part, la séquence 35 RRE placée sous le contrôle de la protéine Rev du HIV et liée à la séquence CRS adjacente. La séquence effectrice placé entre ces deux séquences est constituée par le gène codant pour le fragment A de la toxine diphtérique. Ces deux

séquences imposent une double sécurité à l'expression du fragment A qui ne pourra se faire que dans les cellules infectées par le HIV qui produisent (même à bas bruit comme dans les infections latentes) à la fois les protéines TAT et REV. La séquence TAR (contrôlée par TAT) et la séquence RRE (REV Responsive Element) de HIV-1 répondent aux protéines TAT et REV de HIV-1 et HIV-2 ainsi qu'aux protéines TAX et REX de HTLV-1. Le grand degré de conservation de ces séquences permet de traiter les cellules infectées par les différentes souches de HIV à l'aide de la même construction. L'avantage du parvovirus sur les autres vecteurs de transfection est qu'il n'y a pas intégration dans le génome de la cellule de son matériel génétique, qui reste sous forme épisomiale et ne risque pas d'inactiver un gène oncosupresseur ou d'activer un protooncogène.

L'innocuité et l'efficacité d'un tel traitement devraient permettre son administration également aux patients séropositifs en phase d'infection latente asymptomatique. Le fragment A libéré dans les cellules infectées par HIV, non seulement entraîne la mort cellulaire, mais bloque également toute synthèse protéique y compris la synthèse des protéines virales et de ce fait bloque la réinfection des cellules voisines.

Procédé d'obtention de la construction vectorielle:

25. 1. Isolation de la séquence régulatrice transactivable
 - Amplification par PCR du fragment (-85, +78) du LTR de HIV-I et insertion aux sites SmaI (715 Blunt) et Hind III (689) (compatible avec +78 = site Hind III) du plasmide p Bluescript SK +/-®.
30. La séquence LTR de HIV est ainsi dépourvu des sites NF-KB mais conserve 3 sites SP1, la TATA Box et le TAR (TAT Responsive Element).
2. Isolation et intégration de la séquence effectrice cis-activable
 - Amplification par PCR du fragment DTA placé entre les nucléotides (79) et (653).
 - formation des oligomères Hind III - ATG - (79) - DTA et DTA - (653) - TAG - KpnI

- Insertion du Hind III ATG - (79) - DTA - (653) TAG - KPnI aux sites Hind III (689) et KPnI (657) du plasmide p Bluescript SK +/- LTR HIV.
- Isolation du fragment (2668 bp): KPnI (6346) - CRS - RRE - KpnI (9014) du HIV-I.
- Insertion au site KPnI (657) du plasmide p Bluescript SK +/- LTR - DTA (insertion dans les deux orientations).
- Isolation du fragment

10 BamH I (Bluescript 719) ~ BamH I (HIV 8474) ayant la bonne orientation (2865 pb) et un autre fragment mal orienté (1277 pb).

15 3. Intégration de la séquence effectrice et de la séquence régulatrice dans le vecteur parvoviral

Digestion du vecteur pMM 984 (vecteur MVM) par NCO I (259) et Xba I (4335)

20 ajouter polylinker Bgl II
insérer fragment BamH I - LTR - DTA - CRS - RRE - BamH I et sélectionner les clones ayant la bonne orientation.

25 4. Clonage du vecteur dans E. coli

Les clones ayant la bonne orientation sont sélectionnés et les plasmides isolés.
(Le pMM 984 a tendance lorsqu'il est propagé dans E. Coli de perdre 40 ou 97 paires de base dans le palindrome droit, ce qui n'est pas le cas dans Epicurian Coli sure (Stratagène®)).

30 5. Production de virions

Pour encapsider le génome parvoviral recombinant, un plasmide helper (soit le pMM 984 soit un pMM 984 présentant une délétion dans le palindrome droit) est cotransferté avec le plasmide recombinant sélectionné dans des cellules tumorales.

35 Après 2 jours de culture, les surnageants (2 jours par transfert) sont récoltés. Les cellules sont congelées et décongelées et les virions récoltés et isolés sur gradient de chlorure de césium.

De même, on peut aussi utiliser dans le procédé

susmentionné des cellules "emballageuses" produisant de façon constitutive ou inducible VP1 et VP2.

Exemple 2: Traitement du cancer du sein

Procédé d'obtention de la construction vectorielle

5 1. Isolation de la séquence régulatrice transactivable

- Amplification par PCR du fragment
GAG Hind III - H23 Ag (280) ~ H23 Ag (784) - EcoR I -
GAG de 584 paires de bases de la 5' flanking sequence
de H23 Ag (ATG en 785) à partir de l'ADN génomique de
la lignée (T47D) du cancer mammaire humain.
- Digestion par Hind III et EcoR I et insertion aux sites
Hind III (689) et EcoR I (701) du plasmide p Bluescript
SK +/-.

15 2. Isolation et intégration de la séquence effectrice cis-activable

- Amplification par PCR du fragment
GAG EcoR I - ATG Diphtheria Toxin DTA (79-653) TAG -
Xba I - GAC
fragment codant pour la portion toxique de la toxine
diphérique dépourvue de la séquence "hydrophobic
leader signal sequence"
par l'amorce GAG EcoR I ATG - DTA (79-100) et par
l'amorce DTA (631 - 653) - TAG - Xba I - GAG
- Digestion par EcoR I et Xba I et insertion du fragment
DTA aux sites EcoR I (701) et Xba I (731) du plasmide
p Bluescript SK +/- contenant le fragment H23 Ag.

20 3. Intégration de la séquence effectrice et de sa séquence régulatrice dans le vecteur parvoviral:

Le site Hind III du plasmide PBR 322 dans pMM 984 est
30 détruit en enlevant le fragment Cla I - Nhe I du PBR 322
et en rendant "blunt" les extrémités 5' protrudentes en
présence du fragment de Klenow de la DNA polymérase
d'E. Coli.

Le pMM 984 (Hind III PBR 322-) est alors recircularisé.
35 - Digestion par Hind III et Xba I et insertion du fragment
H23 - ATG - DTA TAG aux sites Hind III (2650) et
Xba I (4339) du plasmide (dépourvu du site Hind III du
PBR 322) pMM 984 en remplacement des séquences codant

pour les protéines VP1 et VP2 du MVMp.

On obtient donc la séquence suivante du MVMp modifié:
Palindrome, Promoteur P4, NSI, NSII, promoteur P38
région promoteur enhancer H23 - ATG - DTA - TAG - sites
5 de polydénylation du MVM, Palindrome.

4. Cotransfection avec du DNA plasmidique de parvovirus sauvage (ou virus avec palindrome 5' non-fonctionnel) pour fournir les capsides virales (VP1 et VP2) dans les cellules productrices de virions.

10 10 Exemple 3: Construction vectorielle à utiliser pour le traitement et le diagnostic de cancer (cancer du sein)

1. Isolation de la séquence régulatrice transactivable

15 L'amplification par PCR du fragment GAG Hind III - H23 Ag (280) ~ H23 Ag (784) - EcoR I - GAG et son insertion aux sites Hind III (689) et EcoR I (701) du plasmide p Bluescript SK +/- se fait comme précédemment.

2. Isolation et intégration de la séquence effectrice cis-activable

20 - Amplification par PCR du fragment
GAG EcoR I - ATG - HSV-1 Thymidine kinase (59 à 1189)
TGA Xba I - GAG
- Insertion aux sites EcoR I (701) et Xba I (731) du plasmide p Bluescript SK +/- contenant le fragment H23 Ag.

25 3. Intégration de la séquence effectrice et de sa séquence régulatrice dans le vecteur parvoviral

Insertion du fragment H23 - Tk aux sites Hind III (2650) et Xba I (4339) du plasmide pMM 984.

30 Synthèse d'iodovinyldéoxyuridine marquée à l'iode 123 pour le traitement et la détection par gammacaméra de cellules cancéreuses exprimant l'HSV-I Tk après infection par le vecteur décrit ci-dessus (Samuel J. et al, Int. J. Appl. Radiat. Isot., vol. 35., n° 11, p. 1049-1052 (1984)).

35 Ex mple 4: Construction vectorielle à utiliser pour le traitement d l'hépatom ou du ch ri carcinom

1. Isolation de la séquence régulatrice transactivable

Amplification par PCR du fragment

GAG Hind III - AFP enhancer (-736, +44) - EcoR I - GAG par

l'amorce GAG Hind III - AFP enhancer (-736, -716) et l'amorce AFP enhancer (+24, +44) EcoR I GAG et insertion aux sites Hind III (689) et EcoR I (701) du plasmide p Bluescript SK +/-.

5 2. Isolation et intégration de la séquence effectrice cis-activable

Amplification par PCR du fragment GAG EcoR I - ATG - DTA (79-653) TAG - Xba I - GAG et insertion aux sites EcoR I (701) et Xba I (731) du plasmide p Bluescript SK +/- contenant l'AFP enhancer.

10 3. Insertion de la séquence effectrice et de sa séquence régulatrice dans le vecteur parvoviral

insertion du fragment AFP enhancer ATG DTA TAG aux sites Hind III (2650) et Xba I (4339) du plasmide pMM 984

15 15. Exemple 5: Traitement de l'infection à cytomegalovirus suivant chez les immunodéprimés

Chez les sujets à immunité normale, l'infection virale est combattue par des lymphocytes T cytotoxiques qui reconnaissent des peptides provenant de protéines virales ayant été dégradées après synthèse endogène par les cellules infectées. Ces peptides sont reconnus en association avec les molécules du MHC classe I (Major Histocompatibility Complex). La destruction des cellules infectées empêche la propagation des virus aux autres cellules en inhibant leur réplication. Les défenses de l'organisme comprennent aussi la production intracellulaire d'interféron et la production d'anticorps spécifiques. En l'absence de médicaments antiviraux spécifiques et tenant compte de l'efficacité limitée de l'immunothérapie passive, l'on propose dans l'invention de traiter les immunodéprimés atteint d'affection virale à l'aide de parvovirus modifiés en remplaçant les séquences codant pour NS-1, NS-2, P38, VP-1 et VP-2 par une séquence promoteur "enhancer" contrôlée par des facteurs de transactivation spécifiques du virus infectant. Cette séquence contrôle l'expression d'une séquence effectrice permettant aux cellules transfectées soit de résister à l'infection soit d'être éliminées.

Bien que l'infection à cytomégalovirus soit asymptomatique chez les individus ayant un système immunitaire

normal, elle devient une cause majeure de décès et de morbidité chez les patients à immunité soit immature (foetus, nouveau-né) soit compromise (receveurs d'allograftes, patients atteints du SIDA). Les infections intra-utérines à CMV 5 sont la seconde cause d'arriération mentale après le syndrome de down. (Griffiths and al., Biochem. J. (1987), 241, p. 313-324)

La pneumonie à CMV est la principale cause de mort après transplantation de moelle osseuse et l'infection discriminée à CMV est la cause majeure de morbidité et de mortalité chez les greffés rénaux ou chez les patients atteints de SIDA.

Après l'infection de la cellule susceptible par le CMV, l'expression temporelle du génome du virus est étroitement contrôlée sous forme d'une synthèse en cascade d'ARN messager et de protéines. L'on distingue les gènes α (ou précoces immédiats), β (ou précoces retardés) et γ (ou tardifs). Les produits des gènes α sont requis par le virus pour prendre le contrôle des synthèses de la cellule hôte, 10 les produits β contrôlent la production de virions tandis que les produits γ forment les composants de structure du virion.

Les protéines α permettent la synthèse d'ARN messager β et les protéines β permettent la réplication de l'ADN qui est suivie par la synthèse de l'ARN messager γ .

25 Les gènes α et β sont transcrits par l'ARN polymérase II cellulaire. Leur expression est contrôlée par des séquences proximales par rapport au promoteur qui sont activées en trans par une protéine structurale du virion.

Selon l'invention, ces séquences sont insérées à 30 la suite du promoteur P4 du parvovirus et sont suivies d'une séquence codant pour un ARN ribozymal clivant spécifiquement l'ARN messager codant pour la protéine α la plus importante (Spaete and Mocarski, 1985, J. virol., 56, 135-143; Sternberg et al, 1984, J. virol., 49, 190-199). Les cellules transférées par le parvovirus modifié de la sorte sont protégées de l'infection par le CMV. En effet, lors de l'infection, l'enlèvement de l'enveloppe virale donne naissance à la protéine structurale qui transactivera la séquence inclue dans le

parvovirus et initiera la production de ribozymes anti mRNA de la protéine α .

Exemple 6: Construction vectorielle comprenant des unités polycistroniques

5 Vecteur parvoviral autonome contenant le gène GMCSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) et le gène PF4 (Platelet Factor 4) sous forme d'une unité bicistronique reliés par l'IRES (Internal Ribosome Entry Site) du virus de l'hépatite C.

10 Dans différents systèmes murins expérimentaux, la réinjection de cellules tumorales irradiées transfectées par un gène codant pour une cytokine (notamment codant pour GMCSF) permet l'éradication de tumeurs préexistantes (Pardoll, Immunology Today, p. 310-316, vol. 14, n° 6 (1993)).

15 Cependant, certaines de ces cytokines (notamment le GMCSF) sont de puissants activateurs de la néovascularisation tumorale. Cette propriété a probablement peu d'importance lorsque les cellules irradiées sont injectées loin des sites tumoraux. Mais, lors de l'utilisation de vecteurs capables

20 de faire exprimer spécifiquement la cytokine par le tissu tumoral, cet effet sur la néovascularisation peut être dommageable. Aussi, le vecteur parvoviral autonome selon l'invention comporte à la fois des séquences codant pour le GMCSF et pour PF 4 (qui est un puissant inhibiteur de la

25 néovascularisation tumorale).

Par PCR, on isole le gène codant pour le GMCSF en lui adjoignant en 5' un site Hind III et en 3' un site NCO I (plasmide GMCSF® du British Technology Group), on modifie le pGEM 7® (Promega) en introduisant au site SmaI, un site 30 NCO I et au site EcoR I, un site BglII. On insère le fragment Hind III-GMCSF-NcoI dans le plasmide pGEM 7 modifié.

On isole par PCR un fragment englobant la séquence comprise entre les nucléotides 101 et 332 de la région non traduite 5' du virus de l'hépatite C. (Tsukiyama-Kohara, 35 Journal of Virology, 1992, 1476-1483). Ce fragment comprend un site NCO I en 5' et un site BglII en 3' englobant l'IRES (101-332). On insère aux sites NCO I et BglII du pGEM 7 modifié contenant le GMCSF. On isole par PCR le fragment

contenant le gène codant pour le PF4 humain (Barone, J. Biol. Chem., 263, 8710-8715 (1988)).

Ce fragment comprend un site BglII en 5' et un site Xba I en 3' englobant le gène PF4.

5 On insère ce fragment entre les sites BglII et Xba I du pGEM 7 modifié contenant le GMCSF et l'IRES.

On isole du pGEM 7 le fragment Hind III-GMCSF-NCOI-IRES-BglII-PF4-Xba I et on insère dans le pMM 984 (délété du site Hind III (9169) entre les sites Hind III (2650) et Xba I (4342)). On construit ainsi un plasmide contenant les gènes GMCSF et PF4 placé sous le contrôle du promoteur P38 du parvovirus MVmp.

Exemple 7: Construction d'un vecteur parvoviral autonome contenant le gène murin B7

15 Dans différents systèmes murins expérimentaux, la réinjection de cellules tumorales irradiées transfectées par le gène murin codant pour la protéine B7 permet l'éradication de tumeurs pré-existantes. On insère le gène murin B7 dans le parvovirus MVmp à la place des gènes codant pour les 20 protéines de capsides VP1 et VP2.

Le plasmide contenant le gène murin B7 est obtenu du centre A.Z. Jette (Vrije Universiteit te Brussel).

Ce gène s'y trouve sous la forme d'un fragment Hind III-XhOI de 944 paires de bases.

25 Le fragment B7 (Hind III-XhOI) est introduit dans les sites Hind III et XhOI du plasmide pGEM 7[®] (Promega), qui contient un site Xba I adjacent au site XhOI.

Par ailleurs, le plasmide pMM 984 contenant le MVmp est déléte du site Hind III (9169) présent dans la partie 30 pBR322 du pMM 984. (Après digestion partielle, le site 9169 est rendu blunt par le fragment de Klenow de la DNA polymerase).

Le gène B7 compris dans un fragment Hind III-Xba I est isolé du pGEM modifié et inséré aux sites Hind III (2650) 35 et Xba I (4342) du MVmp dans le plasmide pMM 984 déléte du site Hind III (9169).

Pour produire les virions recombinants contenant le gène B7, le plasmide pM984 contenant le gène B7 est co-

transfектé avec un plasmide pMM 984 contenant un MVMP déléte du palindrome droit dans des cellules COS. Trois jours après la transfection, les cellules sont congelées et décongelées trois fois et les virions sont récoltés et isolés sur gradient de chlorure de césium.

Les virions isolés sont resuspendus après dialyse dans du PBS pH 7,2 et utilisés pour infecter différentes lignées cellulaires.

Des fibroblastes humains normaux (NHF) obtenus de 10 primoculture et une lignée de fibroblastes humains transformés sont infectés à une multiplicité d'infection (M.O.I.) d'environ 10^{-2} .

L'expression de la protéine B7 à la surface des cellules infectées est mesurée par immunofluorescence à 15 l'aide d'un Fluorescent Activated Cell Sorter (Becton Dickinson).

Les résultats obtenus sur 10.000 cellules mesurées sont les suivants :

		Nombre de cellules exprimant un niveau donné de fluorescence B7 spécifique (Intensité moyenne en unités FACS)	
20		NBK	NHF
	Intensité de fluorescence (Unités FACS)		
	> 1000	12 (1150)	0
	de 750 à 1000	3 (846)	0
	de 500 à 750	11 (626)	0
25	de 250 à 500	13 (372)	0
	de 100 à 250	28 (170)	0
	de 10 à 100	0	0
	< 10	Le reste des 10000 cellules	toutes les cellules

30 Le tableau I ci-dessus montre que dans les cellules NBK 67 cellules possèdent une intensité moyenne en unités FACS supérieure à 100; la moyenne est de 490 et la médiane de 340.

Dans les cellules NHF, toutes les cellules possèdent une intensité moyenne en unités FACS inférieure à 10.

Exemple 8: Construction d'un vecteur parvoviral autonome contenant un ribozym anti bcr-abl inséré au site AseI (2350) du MVMp

- On délète le site AseI (8316) présent dans la partie pBR322 du pMM 984. Après digestion partielle, le site AseI 8316 est rendu blunt par le fragment de Klenow de la DNA polymérase I.
- On synthétise (DNA Synthetiser Applied Biosystems) de l'ADN double brin correspondant à un ribozyme anti bcr-abl. Cet ADN synthétique double brin présente, de part et d'autre, des extrémités protubérantes correspondant au site de restriction AseI.

Le ribozyme anti bcr-abl est constitué de la séquence décrite p. 601 dans l'article de Snyder et al.: Blood, vol. 82, n° 2, 1993, p. 600 à 605, entourée de 2 sites AseI.

L'ADN double brin contenant la séquence codant pour le ribozyme anti bcr-abl entre deux sites AseI est insérée au site AseI (2350) du pMM 984.

Après transformation par électroporation des bactéries *Epicurian Coli Sure*® (Stratagène), les clones positifs (isolés par hybridation avec une sonde radioactive spécifique de la séquence du ribozyme) sont séquencés et les clones possédant un ribozyme dans la bonne orientation sont isolés. La production de virions se fait par transfection de cellules COS ou de cellules NBK.

Afin de stabiliser le ribozyme *in vivo*, l'on ajoute en 3' à la séquence codant pour le ribozyme anti bcr-abl, la séquence codant pour le signal de terminaison de transcription du bactériophage T7 (Sioud et al., J. Mol. Biol. (1993), 223, p. 831-835). L'ensemble est également inséré au site AseI (2350) du pMM 984.

Exemple 9: Construction d'un vecteur parvoviral autonome contenant le gène CAT (chloramphénicol acétyl transférase) en place des gènes codant pour les protéines de capsides

On insère le fragment contenant le gène CAT entre un site Hind III en 5' contigu à l'ATG et un site Xba I en 3' au site Hind III (2650) et Xba I (4342) du plasmide pMM 984 délétré du site Hind III (9169).

La production de virions se fait par cotransfection des cellules COS à l'aide du plasmide obtenu (P38.CAT) et du pMM 984 déléte du palindrome droit du MVMP.

5 Trois jours après la transfection, les cellules sont congelées et décongelées trois fois et les virions sont récoltés et isolés sur gradient de chlorure de césium. Les virions isolés sont resuspendus après dialyse pour infecter différentes lignées cellulaires.

10 La figure 2 montre les courbes de croissance de fibroblastes humains normaux (NHF) et de fibroblastes humains transformés 1, 2 et 3 jours après infection par des virions P38 CAT (MOI < 10^{-2}).

La figure 3 montre la production de la protéine CAT (mesurée par CAT-ELISA de Boehringer) de ces mêmes cellules.

15 Malgré le fait qu'ils se multiplient à un bon rythme, les fibroblastes normaux ne produisent des quantités de protéine CAT qu'à la limite de détection, tandis que les cellules transformées en produisent abondamment.

20 La figure 4 montre l'expression CAT mesurée 2 jours après infection de différentes lignées de cellules humaines normales (en blanc) et de cellules transformées (en rayé). Il en ressort qu'aucune cellule normale ne dépasse le 10 pg/10 microgramme de protéine d'extrait cellulaire.

25 A part les lymphomes B, toutes les cellules transformées testées expriment à des degrés divers des quantités importantes de protéine CAT

REVENDICATIONS.

1. Séquence nucléotidique (1) destinée au traitement de cellules cancéreuses ou soumises à des infections, caractérisée en ce qu'elle comprend, intégré dans la séquence nucléotidique d'un virus (2) appartenant au groupe des parvovirus autonomes, au moins une séquence nucléotidique effectrice (3) susceptible d'assurer la destruction ou la normalisation desdites cellules.
2. Séquence nucléotidique selon la revendication 1 caractérisée en ce que le virus appartient au groupe des parvovirus autonomes oncosélectifs.
3. Séquence nucléotidique selon la revendication 2 caractérisée en ce que le virus est choisi parmi le groupe constitué par le parvovirus H1, le parvovirus variant fibrotropique du "Minute virus of Mice" (MVMp) et le parvovirus Lu III.
4. Séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisée en ce que la séquence nucléotidique du virus est dépourvue des séquences nucléotidiques codant pour les protéines de capsides VP1 et VP2 du parvovirus.
5. Séquence nucléotidique selon la revendication 4, caractérisée en ce que la séquence nucléotidique du virus est également dépourvue de la séquence nucléotidique du promoteur P38 et des séquences nucléotidiques codant pour les protéines non structurelles NSI et NSII du parvovirus.
6. Séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisée en ce que la séquence effectrice (3) comprend plusieurs séquences nucléotidiques codantes (5,6) et/ou non codantes, agencées en sous-unités polycistroniques sous le contrôle d'une seule unité promotrice.
7. Séquence nucléotidique selon la revendication 6 caractérisée en ce que la séquence effectrice (3) comprend entre les séquences nucléotidiques codantes (5,6) au moins un séquenç nucléotidique IRES.
8. Séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisée en ce que la

5 séquence nucléotidique codante effectrice (3) code pour au moins un polypeptide de fusion (7) comportant au moins un ligand (8), de préférence choisi parmi le groupe constitué par l'extrémité hypervariable spécifique d'un anticorps, une cytokine ou un facteur de croissance, ledit ligand (8) étant susceptible de se lier de manière spécifique à au moins une molécule exprimée à la surface des cellules cancéreuses ou soumises à des infections.

10 9. Séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisée en ce que la séquence nucléotidique effectrice (3) comprend au moins une séquence choisie parmi le groupe constitué par les séquences nucléotidiques:

- codant pour un polypeptide cytotoxique ou au moins un fragment de ce polypeptide, de préférence le fragment A de la toxine diphtérique (DTA),
- codant pour une molécule conférant à la cellule transfectée une sensibilité à un agent toxique, de préférence la molécule étant la thymidine kinase de l'Herpès simplex virus type 1 (HSV-TK) et l'agent toxique étant un analogue de guanosine marqué à l'aide des radioisotopes émetteurs d'électrons Auger tels l'Iode 123,
- codant pour au moins un polypeptide ou un fragment de ce polypeptide, augmentant la réponse immunitaire du patient,
- 20 - codant pour au moins un polypeptide ou un fragment de ce polypeptide, inhibant la néoangiogénèse tumorale, de préférence le polypeptide est choisi parmi le groupe constitué par l'interféron α , l'interféron β et/ou le platelet factor 4.

30 10. Séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 caractérisée en ce que la séquence nucléotidique effectrice (3) comprend au moins une séquence nucléotidique pouvant être transcrive en un RNA, de préférence un RNA anti-sens ou un ribozyme susceptible de détruire ou de normaliser des cellules traitées.

35 11. Séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisée en ce qu'elle comprend également au moins une séquence nucléotidique

régulatrice (4) transactivable par des facteurs de transactivation spécifiques de l'affection traitée ou du tissu cellulaire affecté et apte à cisactiver la séquence effectrice (3)

5 12. Séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisée en ce que la séquence nucléotidique régulatrice (4) comporte tout ou une partie de la séquence nucléotidique régulatrice LTR des virus HIV comprenant la séquence TAR.

10 13. Séquence nucléotidique selon la revendication 12 caractérisée en ce que la séquence nucléotidique LTR est dépourvue de la séquence nucléotidique enhancer NF-Kappa B transactivable par des facteurs cellulaires et/ou de la séquence nucléotidique NRE transactivable par le facteur 15 viral NEF.

14. Séquence nucléotidique selon les revendications 12 ou 13 caractérisée en ce que la séquence nucléotidique comporte en outre une seconde séquence nucléotidique régulatrice constituée de tout ou partie de la séquence nucléotidique RRE et de la séquence nucléotidique CRS des virus HIV et 20 des sites adjacents d'épissages.

15. Séquence nucléotidique selon la revendication 11, caractérisée en ce que la séquence nucléotidique régulatrice est constituée d'une séquence nucléotidique promoteur 25 "enhancer" spécifique du cytomégavirus et que la séquence effectrice est transcrrite en un ribozyme clivant spécifiquement l'ARN messager codant pour la protéine α du cytomégavirus.

16. Séquence nucléotidique selon la revendication 30 11 caractérisée en ce que la séquence nucléotidique régulatrice comporte au moins un promoteurs et/ou au moins un enhancer transactivable dans certains tissus spécifiques et choisi(s) parmi le groupe constitué par:

- la séquence nucléotidique contrôlant l'expression du gène 35 codant pour l' α foetoprotéine (AFP),
- la séquence nucléotidique contrôlant l'expression de la protéine placentaire humaine 11 (PP11),
- la séquence nucléotidique contrôlant l'expression de

l'antigène CO - 029,

- la séquence nucléotidique contrôlant l'expression de l'antigène H23,
- la séquence nucléotidique contrôlant l'expression prostatique de la protéine sécrétoire prostatique PSP94,
- 5 - la séquence nucléotidique contrôlant l'expression de la protéine pHGR11 associée au mélanome, au cancer ovarien, à l'adénocarcinome du côlon et de la prostate,
- la séquence nucléotidique contrôlant l'expression de la protéine pHGR74, exprimée dans les testicules, la prostate, la vésicule séminale et la granulosa de l'ovaire,
- 10 - les séquences contrôlant l'expression de protéines spécifiques de l'épithélium mammaire, de l'épithélium utérin,
- la séquence nucléotidique contrôlant l'expression de la tyrosinase, exprimée dans les mélanocytes et le mélanome malin,
- 15 - les séquences contrôlant l'expression de l'élastase, exprimée uniquement dans le pancréas exocrine,
- la séquence nucléotidique contrôlant l'expression hypothalamique de la prolactine et/ou un mélange d'entre elles.

17. Vecteur recombinant comprenant la séquence ou une partie de la séquence selon l'une quelconque des revendications précédentes 1 à 16.

18. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend une ou plusieurs séquences nucléotidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 16 et/ou le vecteur selon la revendication 17 et un véhicule pharmaceutique adéquat.

19. Composition pharmaceutique selon la revendication 12 caractérisée en ce qu'elle comprend également un ou plusieurs agents vitaux sauvages appartenant au groupe des parvovirus autonomes

20. Utilisation d'une composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 18 ou 19, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de cancers ou d'infections.

21. Utilisation d'une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 16 et/ou d'un vecteur

selon la revendication 17 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de cancers ou d'infections.

1/3

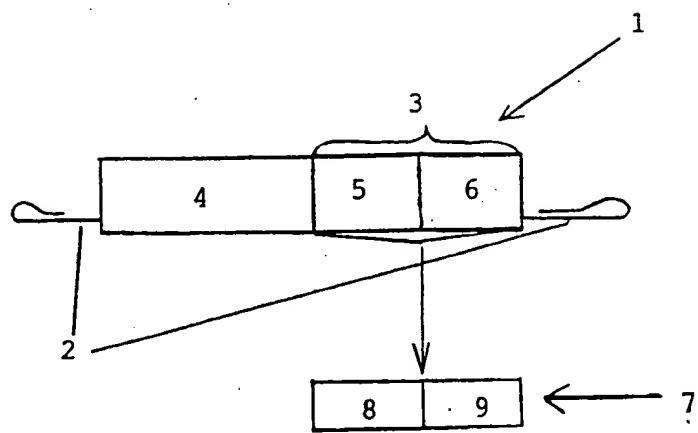


FIG. 1

2/3

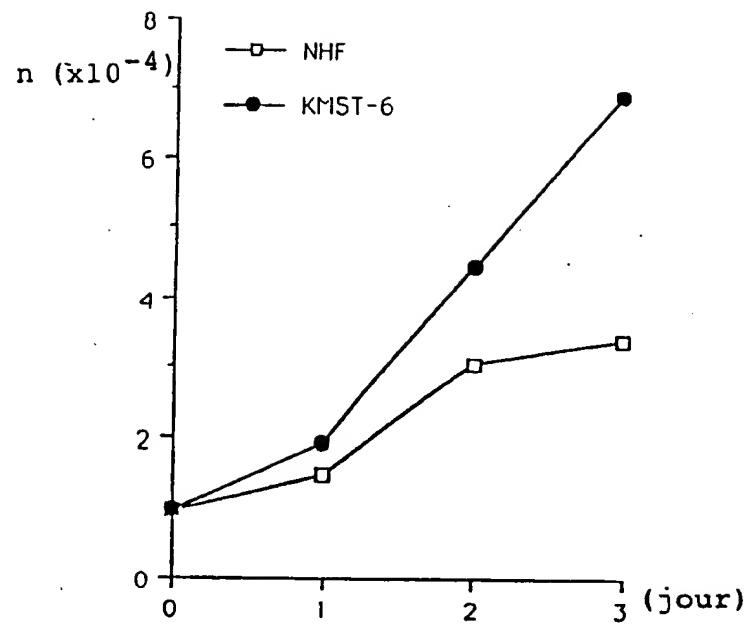


FIG. 2

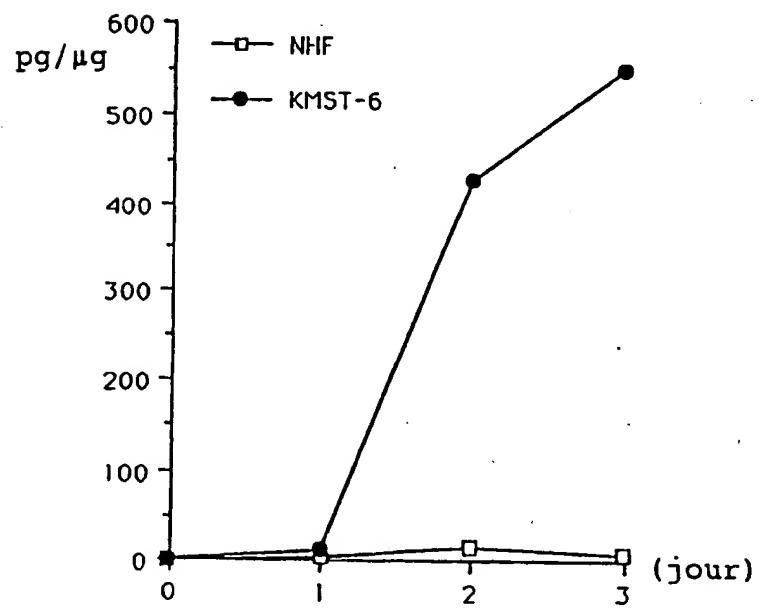


FIG. 3

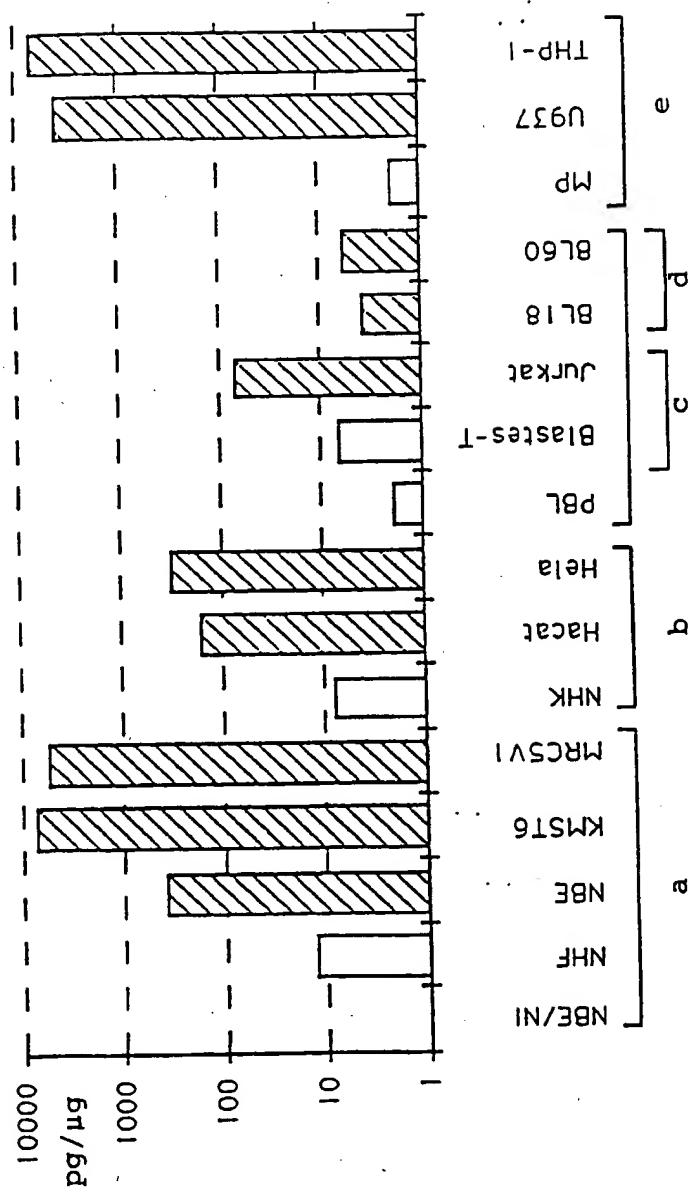


FIG. 4

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MAT					
IPC 5	C12N15/86	A61K48/00	C12N9/00	C12N9/12	C12N15/03
	C12N15/27	C12N15/12	C12N15/62	C12N15/52	C12N15/54

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 C12N A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOURNAL OF VIROLOGY vol. 66, no. 5, May 1992 pages 2821 - 2828 RUSSELL, S.J. ET AL. 'Transformation-dependent expression of interleukin genes delivered by a recombinant parvovirus' see the whole document	1-3, 9, 17, 18
Y	---	1, 4, 6-12, 17, 18, 20, 21
	-/-	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

& document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

23 February 1994

23 02 1994

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED

TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY vol. SUPPL0, no. 16F , 3 April 1992 page 49 MAXWELL, I.H. ET AL. 'Autonomous parvovirus vectors for gene transfer' voir résumé V216	1-3, 17, 18, 20, 21
Y		1, 4, 6-12, 17, 18, 20, 21
0, X	& Keystone Symposium on gene transfer replacement and augmentation Copper Mountain, Colorado, USA 3 au 9 avril 1992 ---	1-3, 17, 18, 20, 21
Y	WO,A,91 18088 (THE UNITED STATES OF AMERICA, DEPARTMENT OF COMMERCE) 28 November 1991 cited in the application see the whole document ---	10-12, 17, 18, 20, 21
Y	WO,A,90 05538 (THE UNITED STATES OF AMERICA, DEPARTMENT OF COMMERCE) 31 May 1990 cited in the application see the whole document ---	4
P, Y	WO,A,93 03143 (ANDERSON W, COUTURE, L & MORGAN, R A) 18 February 1993 see the whole document ---	6, 7
P, Y	WO,A,93 13794 (REPLIGEN CORP.) 22 July 1993 see the whole document ---	9
Y	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 87, no. 22 , November 1990 , WASHINGTON US pages 8746 - 8750 VENTAKESH, L. K. ET AL. 'Selective induction of cytotoxicity to human cells expressing human immunodeficiency virus type 1 Tat by a conditionally cytotoxic adenovirus vector' cited in the application see the whole document ---	10, 12, 17, 18, 20, 21
A	WO,A,88 08450 (FINLAYSON, B. & PECK, A.) 3 November 1988 cited in the application see the whole document ---	1
1 5	WO,A,90 07936 (CHIRON CORPORATION) 26 July 1990 see the whole document ---	1, 6-9, 11, 17, 18, 20, 21
		-/-

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED

TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO,A,90 12087 (NOVACELL CORPORATION) 18 October 1990 see the whole document ---	1,9,12, 20,21
Y	WO,A,91 02805 (VIAGENE) 7 March 1991 see page 53, line 15 - page 56, line 36 see page 61, line 1 - page 74, line 33 -----	1,9,12, 18,20,21

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9118088	28-11-91	AU-A-	7906691	10-12-91
WO-A-9005538	31-05-90	AU-B-	631159	19-11-92
		AU-A-	4661389	12-06-90
		CA-A-	2002839	14-05-90
		EP-A-	0441897	21-08-91
		JP-T-	4502857	28-05-92
WO-A-9303143	18-02-93	NONE		
WO-A-9313794	22-07-93	AU-B-	3592593	03-08-93
		EP-A-	0576669	05-01-94
WO-A-8808450	03-11-88	NONE		
WO-A-9007936	26-07-90	EP-A-	0454781	06-11-91
		JP-T-	4504843	27-08-92
WO-A-9012087	18-10-90	EP-A-	0466815	22-01-92
		JP-T-	4504361	06-08-92
WO-A-9102805	07-03-91	AU-A-	6185390	03-04-91
		CA-A-	2066053	19-02-91
		EP-A-	0487587	03-06-92
		JP-T-	4507196	17-12-92

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEM		C12N15/03	
CIB 5	C12N15/86	A61K48/00	C12N9/00
	C12N15/27	C12N15/12	C12N15/62
			C12N9/12
			C12N15/52
			C12N15/54

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 5 C12N A61K C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	JOURNAL OF VIROLOGY vol. 66, no. 5, Mai 1992 pages 2821 - 2828 RUSSELL, S.J. ET AL. 'Transformation-dependent expression of interleukin genes delivered by a recombinant parvovirus' voir le document en entier	1-3, 9, 17, 18
Y	---	1, 4, 6-12, 17, 18, 20, 21
	-/-	

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité où cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

1

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

23 Février 1994

25 -03- 1994

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentiaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Chambonnet, F

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES CO.

PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY vol. SUPPL0, no. 16F , 3 Avril 1992 page 49 MAXWELL, I.H. ET AL. 'Autonomous parvovirus vectors for gene transfer' voir résumé V216	1-3, 17, 18, 20, 21
Y	& Keystone Symposium on gene transfer replacement and augmentation Copper Mountain, Colorado, USA 3 au 9 avril 1992 ---	1, 4, 6-12, 17, 18, 20, 21
0, X	WO,A,91 18088 (THE UNITED STATES OF AMERICA, DEPARTMENT OF COMMERCE) 28 Novembre 1991 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-3, 17, 18, 20, 21
Y	WO,A,90 05538 (THE UNITED STATES OF AMERICA, DEPARTMENT OF COMMERCE) 31 Mai 1990 cité dans la demande voir le document en entier ---	10-12, 17, 18, 20, 21
P, Y	WO,A,93 03143 (ANDERSON W, COUTURE, L & MORGAN, R A) 18 Février 1993 voir le document en entier ---	6, 7
P, Y	WO,A,93 13794 (REPLIGEN CORP.) 22 Juillet 1993 voir le document en entier ---	9
Y	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 87, no. 22 , Novembre 1990 , WASHINGTON US pages 8746 - 8750 VENTAKESH, L. K. ET AL. 'Selective induction of cytotoxicity to human cells expressing human immunodeficiency virus type 1 Tat by a conditionally cytotoxic adenovirus vector' cité dans la demande voir le document en entier ---	10, 12, 17, 18, 20, 21
A	WO,A,88 08450 (FINLAYSON, B. & PECK, A.) 3 Novembre 1988 cité dans la demande voir le document en entier ---	1
1 5	WO,A,90 07936 (CHIRON CORPORATION) 26 Juillet 1990 voir le document en entier ---	1, 6-9, 11, 17, 18, 20, 21
		-/-

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES CO.

PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications vistées
Y	WO,A,90 12087 (NOVACELL CORPORATION) 18 Octobre 1990 voir le document en entier ---	1,9,12, 20,21
Y	WO,A,91 02805 (VIAGENE) 7 Mars 1991 voir page 53, ligne 15 - page 56, ligne 36 voir page 61, ligne 1 - page 74, ligne 33 -----	1,9,12, 18,20,21

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO-A-9118088	28-11-91	AU-A-	7906691	10-12-91
WO-A-9005538	31-05-90	AU-B- AU-A- CA-A- EP-A- JP-T-	631159 4661389 2002839 0441897 4502857	19-11-92 12-06-90 14-05-90 21-08-91 28-05-92
WO-A-9303143	18-02-93	AUCUN		
WO-A-9313794	22-07-93	AU-B- EP-A-	3592593 0576669	03-08-93 05-01-94
WO-A-8808450	03-11-88	AUCUN		
WO-A-9007936	26-07-90	EP-A- JP-T-	0454781 4504843	06-11-91 27-08-92
WO-A-9012087	18-10-90	EP-A- JP-T-	0466815 4504361	22-01-92 06-08-92
WO-A-9102805	07-03-91	AU-A- CA-A- EP-A- JP-T-	6185390 2066053 0487587 4507196	03-04-91 19-02-91 03-06-92 17-12-92